Journal of Surgery
[Jurnalul de Chirurgie]

Original paper Open Access

Biocompatibilitatea țesutului vascular decelularizat: model *in vitro* pentru testarea grefelor obținute prin metode inginerești

Tatiana Malcova[1,2], Nacu Viorel[2,3], Ciubotaru Anatol[4], Rojnoveanu Gheorghe[1]
[1]Catedra de chirurgie nr. 1 „Nicolae Anestiadi", [2]Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, [3]Catedra de anatomie și anatomie clinică, [4]Cursul de chirurgie cardiovasculară, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova

Abstract. Biocompatibility of decellularized vascular tissue: *in vitro* model for testing tissue-engineered grafts. BACKGROUND: The prevalence of vascular disease continues to increase worldwide. Bypass grafting procedures remain the main therapeutic option for the patients with severe form of disease. Developing a suitable "off-the-shelf" small-diameter vascular graft, vessel size less than 6 mm diameter, has remained a challenge for the past several decades. **AIM**: The study was conducted to evaluate the biocompatibility of an acellular scaffold obtained using the in-house decellularization protocol. **METHODS**: Porcine carotid arteries were isolated and decellularized by incubation in deionized water, sodium dodecyl sulfate, sodium deoxycholate, and Triton X-100, followed by digestion with DNase I. The biocompatibility assay was performed by analysis the ability of endothelial cells to attach to the luminal surface of decellularized tissue. **RESULTS**: Treated arteries were completely devoid of cellular and nuclear material while retaining the integrity of extracellular matrix (ECM). Decellularized arteries supported endothelial adherence and viability of human umbilical vein endothelial cells. **CONCLUSIONS**: The obtained results suggest that the decellularized porcine carotid artery is biocompatible and non-cytotoxic and might be of potential use as a small-diameter vascular graft for bypass surgery.

KEYWORDS: bypass surgery, porcine carotid artery, decellularization, small-diameter tissue-engineered vascular grafts, GFP-HUVECs, biocompatibility

Introducere

Odată cu creșterea incidenței bolilor cardiovasculare, din cauza îmbătrânirii populației și majorării numărului de pacienți diagnosticați cu diabet zaharat de tip II și a frecvenței traumatismelor vasculare mecanice există o necesitate acută în grefe vasculare de diametru mic (d<6 mm) pentru intervențiile de bypass. Grefele sintetice comerciale disponibile pe piață pot fi folosite exclusiv pentru substituirea vaselor cu diametru mare sau mediu (d>6 mm) [1-7]. Ingineria tisulară a devenit un domeniu de cercetare intensă, oferind multe soluții practice indubitabile pentru dezvoltarea unor substituenți vasculari noi, atunci când grefele autologe, precum vena safenă, artera mamară internă și artera radială nu sunt disponibile [2, 5, 8, 9].

Cercetările privind dezvoltarea biomaterialelor de utilizare în ingineria țesutului vascular au început la sfârșitul anilor 1980, iar numărul studiilor în acest domeniu a crescut dramatic în ultimii ani. Materialele care urmează a fi utilizate pentru construirea unui substitut de vas trebuie să imite proprietățile mecanice ale vasului nativ, să fie biocompatibile și să susțină atașarea și proliferarea celulelor [10-12].

Decelularizarea (DC), inclusiv DC țesutului de origine xenogenă, cum ar fi vasele

Corresponding author: Tatiana Malcova, email: tatiana.malcova@usmf.md
March 20, 2023; **Accepted:** May 28, 2023; **Published** June 30,2023
Citation: Malcova Tatiana, Nacu V., Ciubotaru A., Rojnoveanu Ghe. Biocompatibility of decellularized vascular tissue: in vitro model for testing tissue-engineered grafts. Journal of Surgery [Jurnalul de chirurgie]. 2023; 19 (2): 143 -149 . [Article in Romanian]. DOI: 10.7438/JSURG.2023.02.06
Copyright: 2023© : Malcova Tatiana et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

porcine, este studiată ca o soluție strategică optimă pentru dezvoltarea scheletelor pentru ingineria țesuturilor vasculare, inclusiv a vaselor de sânge cu diametru mic. Procedura de DC permite îndepărtarea antigenelor celulare ale gazdei, reducând răspunsul inflamator și minimizând respingerea tisulară mediată imunitar, lăsând un aranjament tubular al matricei extracelulare (ECM), compoziția acesteia (păstrând colagenul, elastina și proteinele glicozaminoglicanice), microstructura vasculară și posibilitatea de a fi repopulată *in vivo* [13-19].

În prezent, sunt utilizate diferite tehnici pentru DC țesutului vascular, precum metodele fizice (înghețare/dezghețare, presiunea hidrostatică), enzimatice, chimice (acizi, baze, detergenți, șoc osmotic) și combinate [1, 2, 4, 15]. Într-adevăr, grefele decelularizate oferă rezultate net superioare față de conductele sintetice alternative. Cu toate acestea, nici substituenții produși prin aceste metode nu sunt perfecți. Defectele acestora includ structuri defectuoase ale pereților vaselor, reziduuri de detergent care influențează viabilitatea celulelor în timpul procesului de recelularizare și riscul de dezvoltare a anevrismelor, hiperplazia intimală și tromboza după grefare din cauza imperfecțiunilor mecanice. Prin urmare, este esențial de dezvoltat o tehnică acceptabilă de DC care să mențină un echilibru între îndepărtarea materialului celular și prezervarea calitativă și cantitativă a compușilor, care formează matricea extracelulară (MEC) [7, 17, 20, 21]. Decelularizarea ineficientă caracterizată prin persistența materialului imunologic străin în matrice poate induce un răspuns inflamator puternic postimplantare, iar deteriorarea excesivă a ultrastructurii și compoziției MEC, a factorilor de creștere poate afecta negativ biocompatibilitatea și capacitatea funcțională a grefei [5, 8, 22, 23]. Ca rezultat, caracteristicile grefelor vasculare obținute prin tehnici inginerești, inclusiv prin tehnica de decelularizare, este un proces complex și multilateral, care, cu părere de rău, încă nu este standardizat [24].

Testul de compatibilitate a matricei acelulare poate fi efectuat *in vitro* și *in vivo*. Testul *in vitro* este utilizat pentru a simula și a prezice reacțiile biologice la matricea acelulară înainte ca materialul să fie plasat în corpul viu. Testul *in vivo* presupune efectuarea experimentelor pe animale de laborator. Investigațiile din această categorie trebuie să fie în conformitate cu Ghidul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator și aprobate de Comitetul instituțional de etică. O modalitate utilă din această perspectivă ar presupune implantarea subcutanată a țesutului decelularizat cu colorare histologică și imunohistochimică ulterioară pentru detectarea fibroblastelor, celulelor endoteliale, macrofagelor, limfocitelor T-ajutătoare și limfocitelor T-citotoxice. În acest fel, prin măsurarea numărului de celule inflamatorii poate fi evaluat răspunsul imun al gazdei [6, 7, 25].

Scop

Studierea biocompatibilității matricei vasculare obținute prin metode inginerești, și anume, tehnica proprie combinată de decelularizare.

Material și metodă

Partea experimentală a studiului a fost efectuată în cadrul Laboratoarelor de Cercetare Leibniz pentru Biotehnologie și Organe Artificiale (LEBAO), Departamentul de Chirurgie Cardiotoracică, Transplant și Chirurgie Vasculară, Școala Medicală din Hanovra, Hanovra, Germania. În calitate de material de testare au fost folosite arterele carotide porcine, prototip de vas de calibru mic. Pentru realizarea scopului am utilizat artere carotide porcine (ACP) de la porci rasa German Landrace, care au fost obținute de la facilitatea pentru animale a Medizinische Hochschule Hannover (MHH). După prelevare, vasele au fost transportate imediat în laborator în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). Vasele au fost clătite în PBS pentru eliminarea resturilor și cheagurilor de sânge. Ulterior, țesutul conjunctiv în exces și țesutul adipos au fost îndepărtate cu precauție cu ajutorul unui bisturiu și foarfecelor. Fragmentele de vase din grupul de control și experimental au fost păstrate la temperatura -80°C.

Arterele carotide porcine crioprezervate (trei probe biologice) au fost prelucrate cu: (1) soluție hipotonă, și anume dH_2O, timp de 24 de ore; (2) detergenți timp de 36 ore (expunere la soluție 0,5% [SDS + SDC] timp de 12 ore, urmată

de expunerea la 1% Triton X-100 timp de 24 de ore; (3) supuși digestiei enzimatice (expunere timp de 48 de ore la 300 U/ml DNază I). S-au aplicat multiple etape de spălare intermitentă cu soluție PBS pentru eliminarea eficientă a detergenților reziduali și a resturilor celulare.

Analiza histologică (H&E) a fost utilizată ca metodă de determinare a calității decelularizării, și anume, ca metodă de confirmare a îndepărtării celulelor. Pentru reînsămânțarea matricelor obținute cu celule endoteliale din vena ombilicală umană marcate cu proteină verde fluorescentă (GFP-HUVEC) a fost utilizată metoda pentru testarea biocompatibilității. Pentru obținerea numărului necesar de celule, GFP-HUVEC au fost cultivate în mediu de creștere endotelială (EGM-2, Lonza) la 37^{o}C, 5% CO_2. Segmentele arteriale decelularizate au fost tăiate longitudinal și deschise cu obținerea a trei fragmente 10 x 10 mm, care ulterior au fost fixate cu suprafața luminală orientată în sus cu două inele metalice în plăci pentru a preveni curbarea în placa sterilă pentru cultivarea celulelor, 12 godeuri (figura 1). GFP-HUVECs au fost însămânțate pe aceste fragmente. Celulele au fost apoi incubate timp de 5 zile la 37^{o}C și 5% CO_2. Mediul a fost schimbat la fiecare două zile. În fiecare zi probele au fost examinate cu ajutorul stereomicroscopului Discover V8 Stereomicroscope. Celulele cultivate pe suprafața de plastic a vasului au fost utilizate ca martor [26].

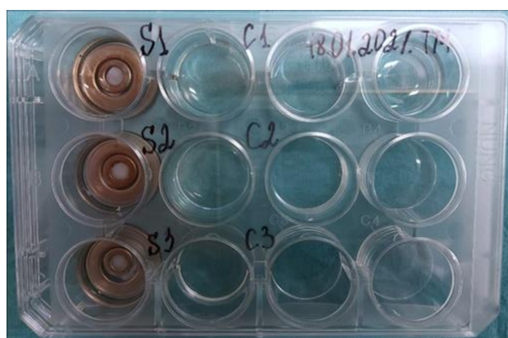


Figura 1: model de testare a biocompatibilitatii tesutului vascular decelularizat [25]

Testul viu/mort (Live/Dead Assay) a fost efectuat în ziua a 6-a de cultivare a celulelor pentru a determina viabilitatea celulelor dintr-o populație. Principiul procedurii se bazează pe determinarea integrității membranei plasmatice și a activității esterazei. Reactivii fluorescenți folosiți în experiment, și anume, calceina acetoximetil (calcelin-AM) și homodimerul de etidiu-1 (EthD-1), au fost preparați separat în PBS. Soluțiile au fost adăugate în fiecare godeu și incubate la 37^{o}C, 5% CO_2, timp de 30 de minute. Probele au fost examinate cu ajutorul stereomicroscopului Discover V8 Stereomicroscope pentru evaluarea viabilității celulelor. Celulele vii colorate cu calceină-AM au generat culoarea verde fluorescent la excitarea citoplasmei acestora. Celulele moarte marcate cu EthD-1 au generat fluorescență roșie [7].

Rezultate și discuții

În acest studiu am descris o tehnică pentru dezvoltarea grefelor vasculare de diametru mic din artera carotidă porcină, folosind metoda de decelularizare. Colorația histologică a confirmat eficacitatea procedurii DC [27, 28]. Pentru a testa dacă arterele decelularizate susțin endotelizarea, GFP-HUVECs au fost însămânțate pe suprafața luminală a patch-urilor arteriale decelularizate și incubate pentru diferite perioade de timp. După o perioadă de incubare de 5 zile celulele au fost distribuite pe toată suprafața patch-ului și au format un strat aproape confluent (figura 2A). După 6 zile de cultivare a celulelor testul viu/mort (Live/Dead Assay) a arătat persistența celulelor vii distribuite uniform cu câteva celule moarte în cadrul probelor (figura 2B). Rezultatele testelor efectuate au demonstrat că metoda combinată de decelularizare bazată pe utilizarea factorilor chimici și enzimatici este o soluție optimă în ingineria tisulară pentru crearea substituenților vasculari de calibru mic, deoarece matricile obținute permit reendotelizarea cu celule autologe înainte de implantare.

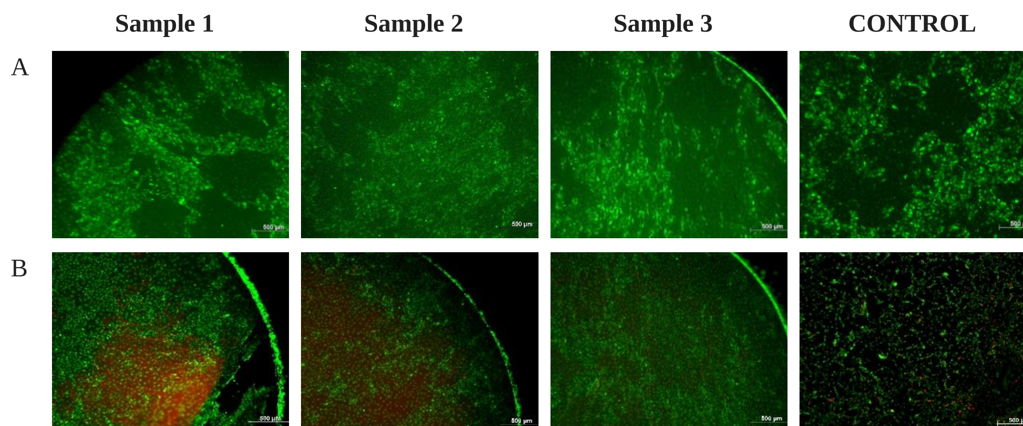


Figura 2: A - evaluarea viabilității GFP-HUVEC aplicate pe suprafața luminală a grefei decelularizate (a cincea zi de cultivare); B - testarea viu/mort (Live/dead assay) (a șasea zi de cultivare)

Testarea biocompatibilității este obligatorie înainte de implantarea țesutului, având în vedere că succesul practic al matricelor acelulare depinde de capacitatea acestora de a oferi un mediu conductiv pentru atașarea și proliferarea celulelor, precum și remodelarea ECM [11]. O grefă vasculară ideală ar trebui să susțină endotelizarea, deoarece s-a demonstrat că un strat endotelial confluent și funcțional este esențial pentru îmbunătățirea funcționalității grefei și prevenirea trombozei postimplantare [29, 30]. În pofida faptului că numeroase studii sunt efectuate în domeniul dezvoltării grefelor ingineresti prin tehnica de decelularizare și detergentul SDS ca agent DC este folosit destul de frecvent datorită eficienței sale ridicate, un număr limitat de studii a fost focusat pe investigarea efectelor citotoxice ale agenților de DC asupra viabilității celulare. Cu toate că, este cunoscut faptul că celulele sunt foarte sensibile chiar și la concentrații mici de SDS [23, 31-34].

În timp ce studiau condițiile experimentale optime pentru decelularizarea vaselor sanguine, Simsa R *et al* (2018) au evaluat sistematic cinci protocoale diferite de DC bazate pe utilizarea detergenților (SDS, SDC, Triton X-100 și CHAPS) cu/fără enzimele pentru eliminarea ADN-ului celular, vena cava porcină fiind utilizată ca model de testare. Țesutul prelucrat a fost examinat multilateral prin teste calitative (colorația DAPI, examenul imunohistochimic) și cantitative (cuantificarea ADN-ului restant, colagenului, GAG-lor, aprecierea rezistenței mecanice). Cititoxicitatea și biocompatibilitatea matricei la fel a fost evaluată prin testele MTT și MTS. Rezultatele obținute au demonstrat că probele prelucrate cu SDS au avut compatibilitate proastă, pe când cele mai bune rezultate pentru repopularea *in vitro* cu celule endoteliale au fost obținute în lotul Triton X-100. Acest fapt se explică, pe de o parte, prin îndepărtarea ineficientă a detergentului ionic puternic, cum este SDS, din matrice, pe de altă parte - prin potențialul său de a denatura proteinele structurale din matricea extracelulară [35].

Perioadele de spălare intermitentă incluse în protocolul actual au permis eliminarea eficientă a agenților de DC reziduali și a resturilor celulare, îmbunătățind calitatea produsului acelular. Aceiași recomandare a fost elaborată de Pu *et al* (2008), care au reușit să demonstreze că efectul citotoxic al detergenților poate fi redus prin creșterea numărului de cicluri de spălare [31]. Perea-Gil *et al* (2015) au aplicat o spălare extensivă pentru realizarea DC țesutului miocardic [35]. În plus, spălarea probelor cu Triton X-100 post-expunere SDS pare a fi o alegere logică, deoarece acest detergent non-ion poate înlocui SDS restant în matrice [21, 35].

Concluzii

1. Metoda combinată de decelularizare bazată pe utilizarea factorilor chimici și enzimatici este o soluție optimă în ingineria tisulară pentru crearea substituenților vasculari de calibru mic.

2. Arterele carotide porcine decelularizate sunt biocompatibile și pot deveni un potențial substituent vascular în activitatea clinică pentru înlocuirea vaselor de diametru mic. Cu toate acestea, sunt necesare experimente suplimentare pe animale pentru a confirma acest lucru înainte de utilizarea clinică.

Mulțumiri

Îi mulțumim domnului Dr. phil. Andres Hilfiker și Dr. rer. nat. Birgit Andrée (Medizinische Hochschule Hannover, Hanovra, Germania) pentru asistență în realizarea cercetărilor, efectuarea măsurătorilor și pentru comentariile valoroase privind rezultatele experimentale.

CONFLICT DE INTERESE

Autorii declară că nu sunt conflicte de interese. Au fost respectate condițiile etice ale cercetării științifice.

Bibliografie

1. Naito Y, Shinoka T, Duncan D et al. Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. Adv Drug Deliv Rev. 2011; 63: 312–323.
2. Hoenig MR, Campbell GR, Rolfe BE, Campbell JH. Tissue-engineered blood vessels: Alternative to autologous grafts? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 1128–1134.
3. Rosamond W, Flegal K, Friday G et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association statistics committee and stroke statistics subcommittee. Circulation. 2007; 115: e69-171.
4. Chlupac J, Filova E, Bacakova L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. Physiol Res. 2009; 58 (Suppl 2): S119-139.
5. Tardalkar KR, Marsale TB, Bhamare NC et al. Heparin coated decellularized xenogeneic small diameter vascular conduit for vascular repair with early luminal reendothelialization. Cell Tissue Bank. 2023; 24(2): 449-469.
6. Kostelnik C, Hohn J, Escoto-Diaz CE et al. Small-diameter artery decellularization: Effects of anionic detergent concentration and treatment duration on porcine internal thoracic arteries. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2022; 110(4): 885-897.
7. Eyre K. Investigation of decellularized biological grafts for human vascular replacement [PhD Thesis]. Leibniz Forschungs laboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO). Hanover, Germany. 2019.
8. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter artificial arteries engineered *in vitro*. Circ Res. 2006; 98: 25-35.
9. Jenndahl L, Österberg K, Bogestål Y et al. Personalized tissue-engineered arteries as vascular graft transplants: A safety study in sheep. Regen Ther. 2022; 21: 331-341.
10. McBane JE, Sharifpoor S, Labow RS, Ruel M, Suuronen EJ, Santerre JP. Tissue engineering a small diameter vessel substitute: engineering constructs with select biomaterials and cells. Curr Vasc Pharmacol. 2012; 10(3): 347-360.
11. Wang X, Chan V, Corridon PR. Decellularized blood vessel development: Current state-of-the-art and future directions. Front Bioeng Biotechnol. 2022; 10: 951644.
12. Weekes A, Bartnikowski N, Pinto N, Jenkins J, Meinert C, Klein TJ. Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts. Acta Biomater. 2022; 138: 92-111.
13. Zhai W, Zhang H, Wu C et al. Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood vessel replacement. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014; 102(6): 1190-1198.

14. Zhu C, Ying D, Mi J et al. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix. Biomaterials. 2008; 29: 2628– 2636.
15. Ketchedjian A, Kreuger P, Lukoff H et al. Ovine panel reactive antibody assay of HLA responsivity to allograft bioengineered vascular scaffolds. J Thorac Cardiovasc Surg. 2005; 129: 159-166.
16. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. J Vasc Surg. 2004; 40: 146-153.
17. Amiel GE, Komura M, Shapira O et al. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. Tissue Eng. 2006; 12(8): 2355-2365.
18. Du P, Li X, Sun L et al. Improved hemocompatibility by modifying acellular blood vessels with bivalirudin and its biocompatibility evaluation. J Biomed Mater Res A. 2022; 110(3): 635-651.
19. Eventov-Friedman S, Katchman H, Shezen E et al. Embryonic pig liver, pancreas, and lung as a source for transplantation: optimal organogenesis without teratoma depends on distinct time windows. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(8): 2928-2933.
20. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. Biomaterials. 2012; 33(6): 1771–1781.
21. Pantic IV, Shakeel A, Petroianu GA, Corridon PR. Analysis of vascular architecture and parenchymal damage generated by reduced blood perfusion in decellularized porcine kidneys using a gray level Co-occurrence matrix. Front. Cardiovasc. Med. 2022; 9:797283.
22. White LJ, Taylor AJ, Faulk DM et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. Acta Biomater. 2017; 50: 207-219.
23. Massaro MS, Kochová P, Pálek R et al. Decellularization of Porcine Carotid Arteries: From the Vessel to the High-Quality Scaffold in Five Hours. Front BioengBiotechnol. 2022; 10: 833244.
24. Sung SY, Lin YW, Wu CC et al. Supercritical carbon dioxide-decellularized arteries exhibit physiologic-like vessel regeneration following xenotransplantation in rats. Biomater Sci. 2023; 11(7): 2566-2580.
25. Ji W, Yang F, Seyednejad H, Chen Z, Hennink WE, Anderson JM, et al. Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA-based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation. Biomaterials. 2012;33(28):6604-14.
26. Malcova T, Rojnoveanu Gh, Ciubotaru A, Nacu V. *In vitro* model of biocompatibility evaluation: a new approach for testing the decellularized vascular scaffolds. Proceedings of the 15th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation. 2023:169-170.
27. Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, Andrée B, Hilfiker A. Protocolul de decelularare a vaselor sanguine este dependent de diametrul acestora. Chirurgia (Bucur). Conferința Națională de Chirurgie 2021. Ediție on-line. 2021;116(Suppl.1):118-119.
28. Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, Andrée B, Hilfiker A. Qualitative evaluation of detergent-enzymatic decellularized small-caliber blood vessels. Abstract Book. MedEspera 2022: 9th Intern. Medical Congress for Students and Young Doctors. 2020:437.
29. Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. Tissue Eng Part A. 2009; 15(9): 2665-2676.
30. Rashid ST, Salacinski HJ, Fuller BJ, Hamilton G, Seifalian AM. Engineering of bypass conduits to improve patency. Cell Prolif. 2004; 37(5): 351-366.
31. Pu L, Wu J, Pan X et al. Determining the optimal protocol for preparing an acellular

scaffold of tissue engineered small-diameter blood vessels. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018; 106(2): 619-631.

32. Fooladi S, Faramarz S, Dabiri S, Kajbafzadeh A, Nematollahi MH, Mehrabani M. An efficient strategy to recellularization of a rat aorta scaffold: an optimized decellularization, detergent removal, and Apelin-13 immobilization. Biomater Res. 2022; 26(1): 46.

33. Andrée B, Bela K, Horvath T et al. Successful re-endothelialization of a perfusable biological vascularized matrix (BioVaM) for the generation of 3D artificial cardiac tissue. Basic Res Cardiol. 2014; 109(6): 441.